PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/47684 (51) Internationale Patentklassifikation 6: **A2** C12N 15/53, 9/04, C12P 7/02 (43) Internationales 23. September 1999 (23.09.99) Veröffentlichungsdatum:

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/00848

(22) Internationales Anmeldedatum:

18. März 1999 (18.03.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 12 004.4

19. März 1998 (19.03.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

HUMMEL, Wemer (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): [DE/DE]; Claudiusstrasse 11, D-52445 Titz (DE). Bettina [DE/DE]; Waidmannstrasse D-60596 Frankfurt am Main (DE).

**FORSCHUNGSZENTRUM** (74) Gemeinsamer Vertreter: JÜLICH GMBH; Personal und Recht - Patente - (PR-PT), D-52425 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: DEHYDROGENASES WITH IMPROVED NAD-DEPENDENCE, THE PRODUCTION THEREOF, AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: DEHYDROGENASEN MIT VERBESSERTER NAD-ABHÄNGIGKEIT, DEREN HERSTELLUNG UND VERWEN-DUNG

# (57) Abstract

The NADH specificity of preferred NADPH-dependent dehydrogenases can be improved by basicity reduction in the coenzyme docking area through corresponding genetically engineered modification of the relevant amino acid sequence. Dehydrogenases with NADH-dependence suitable for preparative purposes which correspond to a k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> value for NAD+≥20 can be microbially obtained. To this end, a microorganism is used which codes for the enzyme and which has a gene sequence in the genetic code. The gene sequence codes for the enzyme with an amino acid sequence whose basic amino acid(s) are at least partially replaced on the coenzyme binding site or sites by uncharged amino acids. Alternatively or additionally, basic or positively charged or uncharged amino acid(s) can be replaced by negatively charged amino acid(s). The inventive method is especially used for obtaining short-chain dehydrogenases with coenzyme binding sites on the N-terminus. According to the example, alcohol-dehydrogenases were obtained with the aid of E.coli HB101+ (pUBS 520) which contains the mutated gene in an overexpressed manner. Said gene codes for the dehydrogenase and is cloned in the expression plasmi pKK-117-3HB.

#### (57) Zusammenfassung

Die NADH-Spezifität von bevorzugt NADPH-abhängigen Dehydrogenasen kann durch Basizitätsminderung im Coenzym-Andockbereich durch entsprechende gentechnologische Abwandlung der relevanten Aminosäure-Sequenz verbessert werden. S können Dehydrogenasen mit für präparative Zwecke tauglicher NADH-Abhängigkeit entsprechend einem kcat/KM- Wert für NAD+ ≥ 20 mikrobiell dadurch gewonnen werden, daß man einen für das Enzym kodierenden Mikroorganismus mit einer Gen-Sequenz im genetischen Kode verwendet, die für das Enzym mit einer Aminosäure-Sequenz kodiert, deren basische Aminosäure(n) an der Coenzym-Bindungsstelle bzw. den -stellen zumindest teilweise durch ungeladene Aminosäuren ersetzt ist bzw. sind. Alternativ oder zusätzlich können basische bzw. positiv geladene oder ungeladene Aminosäure(n) durch negativ geladene Aminosäure(n) ersetzt sein. Das Verfahren wird insbesondere für die Gewinnung von short-chain Dehydrogenasen mit Coenzym-Bindungsstellen am N-Terminus angewandt. Gemäß Beispiel wurde Alkohol-Dehydrogenase mit Hilfe von E.coli HB101+ (pUBS 520) gewonnen, der das für die Dehydrogenase kodierende mutierte Gen, kloniert im Expressionsplasmi pKK-117-3HB, überexprimiert enthält.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland ·	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF.	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# Dehydr genasen mit verbesserter NAD-Abhängigkeit, deren Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der NADH-Spezifität von bevorzugt NADPH-abhängigen Dehydrogenasen, das insbesondere zur Gewinnung von Dehydrogenase - speziell von short-chain Dehydrogenasen und vorzugsweise Alkohol-Dehydrogenasen - mit für präparative Zwecke tauglicher NADH-Abhängigkeit entsprechend einem  $k_{cat}/K_M$ -Wert für NAD $^+ \ge 20$  brauchbar ist und sie umfaßt danach erhältliche Dehydrogenasen und deren Verwendung.

Dehydrogenasen und insbesondere Alkohol-Dehydrogenasen (nachfolgend durch ADHn abgekürzt) sind wertvolle Katalysatoren zur Gewinnung chiraler Produkte durch stereoselektive Reduktion prochiraler Ketone zu den entsprechenden chiralen Alkoholen. Kommerziell verfügbar sind im wesentlichen entsprechende Enzyme aus Hefe (NAD-abhängig), Pferdeleber (NAD-abhängig) und Thermoanaerobium brockii (NADP-abhängig), für spezielle Substrate auch noch beispielsweise Steroid-Dehydrogenasen (NAD- und NADP-abhängig). Wegen des teilweise recht begrenzten Substratspektrums sind in den letzten Jahren weitere neue ADHn gefunden worden, die gerade für den präparativen Einsatz gut geeignet sind, beispielsweise eine (S)-spezifische ADH aus Rhodococcus erythropolis (NAD-abhängig) oder (R)-spezifische Enzyme aus der Gattung Lactobacillus. Beide Enzymtypen setzen ein sehr breites Spektrum an Ketonen mit hoher Enantioselektivität um. Die Enzyme aus L. kefir (DE 40 14 573) oder L. brevis sind besonders interessant, da sie als einzige zu (R)-Alkoholen führen. Nachteilig für eine Anwendung dieser Enzyme ist allerdings, daß sie das Coenzym NADP<sup>+</sup>, bzw. NADPH benötigen, da dieses Coenzym beträchtlich instabiler und teurer (Faktor 5-10) als NAD+ bzw. NADH ist.

Ziel der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Verbesserung der NAD<sup>+</sup>-Abhängigkeit solcher ADHn, das aber auch ganz allgemein zur entsprechende Verbesserung von Dehydrogenasen anwendbar ist.

Das zu diesem Zweck entwickelte erfindungsgemäße Verfahren der eingangs genannten Art ist im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß man die Basizität des Enzyms im Coenzym-Andockbereich durch angemessene Änderung der Aminosäure-Sequenz mit Hilfe gentechnologischer Mittel vermindert. Diese Basizitätsminderung der Aminosäurereste der Dehydrogenase im Coenzym-Andockbereich kann insbesondere druch Austausch positiv geladener Aminosäure(n) gegen ungeladene Aminosäure(n) erreicht werden.

Alternativ oder zusätzlich kann die Basizität der Aminosäuren der Dehydrogenase im Coenzym-Andockbereich auch durch Austausch neutraler oder positiv geladener Aminosäure(n) gegen negativ geladene Aminosäure(n) vermindert werden. wobei zur Basizitätsminderung natürlich Kombinationen dueser Abwnadlungen vorgesehen werden können.

Weitere Besonderheiten der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

Dieses Verfahren geht davon aus, daß für die Mitwirkung des Coenzyms bei der enzymatischen Redoxreaktion eine Akzeptanz des Coenzyms an der Coenzym-Bindungsstelle bedeutsam ist und daß durch Minderung der Basizität im "Andockbereich" des Enzyms für das Coenzym durch entsprechende Änderung der Aminosäure-Sequenz eine Verbesserung der Akzeptanz von NAD<sup>+</sup> im Vergleich zum NADP<sup>+</sup> erreicht werden kann. Die Realisierung einer solchen Abwandlung wurde gentechnologisch vorgenommen und untersucht und auf diese Weise eine deutlich faßbare Verbesserung erzielt, wie aus der nachfolgenden Beschreibung ersichtlich werden wird.

Als Realisierungsbeispiel diente die ADH aus Lactobacillus brevis (DSM 20 054), bei der eine Coenzym-Bindungsstelle im N-Terminus vermutet wird und deren Sequenz der ersten 50 Aminosäuren im N-terminalen Bereich lautet:

S-N-R-L-D-G-K-V-A-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G-R-H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-K-S-V<sub>50</sub> Die vollständige Sequenz einer Untereinheit dieser ADH, die aus vier identischen Untereinheiten besteht, ist in der Dissertation B. Riebel (1997, Universität Düsseldorf) veröffentlicht, ebenso dort die zugehörige DNA-Sequenz, über die letztendlich die Mutation erfolgt.

Bei dieser N-terminalen Sequenz wurden mit Hilfe an sich bekannter gentechnologischer Methoden bestimmte basizitätsrelevante Aminosäuren ausgetauscht und die Veränderung der Akzeptanz von NAD⁺ an Hand von zwei Größen ermittelt: durch Bestimmung des K<sub>M</sub> und des k<sub>cat</sub> Wertes. Der K<sub>M</sub>-Wert (Michaelis-Menten-Konstante [Mol/L]) kann als Maß für die Affinität des Coenzyms zum Enzym betrachtet werden, vorteilhaft ist ein möglichst kleiner K<sub>M</sub>-Wert. Der k<sub>cat</sub>-Wert (Mol gebildetes Produkt/Mol Enzym x sec) ist ein Maß für den Umsatz, er sollte möglichst hoch sein. Ein kombinierter Wert, der beide Größen berücksichtigt, ist der Quotient k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>. Dieser sollte zum Erreichen eines für präparative Zwecke nützlichen Enzyms vorzugsweise ≥20 sein.

In den folgenden Beispielen 1-4 wurde ein Austausch basischer gegen neutrale Aminosäuren wurde an den Stellen R38, H39, K45 und/oder K48 vorgenommen. Die Charakterisierung der Mutanten zeigt, daß es tatsächlich möglich ist, die Spezifität der ADH aus L. brevis von NADP<sup>+</sup> hin zum NAD<sup>+</sup> zu verändern. Obwohl nur eine begrenzte Zahl von Aminosäure-Austauschen durchgeführt wurde, zeigen die Ergebnisse, daß die gewünschte Verbesserung der NAD<sup>+</sup>-Abhängigkeit durch Basizitätsminderung erreicht werden kann.

Ein in den nachfolgenden Beispielen zusätzlich durchgeführter Austausch von A9G (Alanin gegen Glycin; beide sind ungeladen) wurde nicht aus Gründen der Basizitätsänderung vorgenommen, sondern in Anbetracht zusätzlicher Stabilitätsüberlegungen. Es ist klar und belegbar, daß die durch den erfindungsgemäßen Austausch zur Basizitätsminderung erzielte NAD<sup>+</sup>-Spezifitätsänderung durch diesen in den nachfolgenden Beispielen "begleitenden Austausch" (A9G) nicht merklich beeinflußt wird.

Abgesehen von den im N-Terminus-nahen Bereich der ADH aus L. brevis vorgenommenen - nicht erschöpfenden - Aminosäure-Austauschen kann ein solcher Austausch selbstverständlich auch in der verbleibenden Aminosäure-Kette (gemäß Dissertation, s.o.) durchgeführt werden und auf positiven Erfolg bzgl. der Spezifität für NAD<sup>+</sup> überprüft werden.

Ganz allgemein setzt das erfindungsgemäße Verfahren zur Abwandlung von Dehydrogenasen natürlich die Kenntnis bzw. einleitende Bestimmung der zu verändernden Aminosäure-Sequenz des zu verbessernden Enzyms voraus, um einen gezielten Austausch basischer Aminosäuren durch ungeladene oder auch durch negativ geladene Aminosäuren bzw. einen Austausch ungeladener gegen negativ geladene Aminosäuren vornehmen zu können. Der für die NAD-Spezifitätsverbesserung nützliche Austausch bzw. Austauschbereich ergibt sich dann - auch ohne Vorab-Kenntnis der Coenzym-Bindungsstelle - nach dem trial-and-error-Prinzip, wobei die derzeit kommerziell zur Verfügung stehenden Fertig-Kits für die wesentlichen Teilschritte der gentechnologischen Arbeiten diese ohne allzu großen Aufwand durchführbar machen. Als basische Aminosäuren können insbesondere Lysin und Arginin ausgetauscht werden, und zwar vorzugsweise gegen ungeladene wie beispielsweise Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Serin, Tyrosin oder Phenylalanin. Von den negativ geladenen Aminosäuren kommen insbesondere Glutaminsäure und Asparaginsäure in Betracht.

Der Nachweis der positiven Veränderung der mutierten Enzyme erfolgte durch die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Coenzyme NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH und NADPH über die entsprechenden kinetischen Parameter für das Keton-Substrat (Acetophenon) bzw. bei der Oxidationsreaktion für den Alkohol (Phenylethanol). Des weiteren wurde am Beispiel der Reduktion von Acetophenon geprüft, ob die Enantioselektivität erhalten geblieben ist. Im übrigen wurden Temperatur-optima und – stabilität, pH-optima und -stabilität und der isoelektrischen Punkt bestimmt und mit den entsprechenden Daten für das nichtmutierte Wildtyp-Enzym verglichen.

Das Wildtyp-Enzym zeigt folgende Eigenschaften:

A) Kinetische Daten für die Coenzyme NADP<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup>, NADPH und NADH (Tab. 1):

Tabelle 1: Kinetische Daten für die oxidierten und reduzierten Coenzyme bei Reaktion mit der ADH aus Lactobacillus brevis.

Parameter	K <sub>M</sub> -Wert [mM]	k <sub>cat</sub> -Wert [sec <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_{M}$ [mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> ]
NADP <sup>+</sup>	0,241	65	270
$NAD^{\dagger}$	2,938	21	. 7
NADPH	0,218	536	2461
NADH	nicht meßbar	nicht meßbar	-

Tabelle 1 zeigt, daß das Coenzym NADH vom Wildtyp der ADH aus *L. brevis* im Rahmen der Nachweismöglichkeit nicht umgesetzt wird. Lediglich sehr hohe Konzentrationen von NAD<sup>+</sup> werden mit schwacher Aktivität akzeptiert, so daß die Selektivität (k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>) des Wildtyps für NAD<sup>+</sup> (=7) im Vergleich zum Wert für NADP<sup>+</sup> (=270) bei ca. 2,5% liegt.

# B) Temperaturoptimum und --stabilität

Das Temperaturoptimum der Wildtyp-ADH liegt bei 55°C, nach 24-stündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen zeigt es bei 30°C noch 100% Restaktivität, bei 37°C noch 50%.

#### C) pH-Optimum und -stabilität

Das pH-Optimum für die Reduktion von Acetophenon mit NADPH liegt bei 6,5. Der optimale Bereich ist sehr schmal, bereits bei pH 6,0 oder 7,0 findet man nur noch ca. 60% Restaktivität. Für die Oxidation von Phenylethanol mit NADP<sup>+</sup> liegt das Optimum bei 8,0 mit einem breiteren Optimumsbereich von 7-9. Das Wildtyp-Enzym zeigt höchste Stabilität bei Lagerung bei pH 7,0 bis 8,5.

- D) Bestimmung des isoelektrischen Punkts

  Der isoelektrische Punkt des Wildtyp-Enzyms liegt bei 4,95.
- E) Reduktion von Acetophenon im Batch unter Coenzym-Regenerierung und Bestimmung der Enantioselektivität dieser Umsetzung

  Die Reduktion von Acetophenon mit NADPH mit dem Wildtyp-Enzym unter

  Coenzym-Regenerierung zeigt bei gaschromatographischer Trennung ausschließlich das

  (R)-Isomere von Phenylethanol.

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung und Charakterisierung von Mutanten beschrieben, bei denen mit gentechnischen Methoden Aminosäuren im N-terminalen Bereich ausgetauscht wurden.

#### Beispiel 1:

# Herstellung und Charakterisierung der Mutante 1 (A9G, R38L, K45I):

Ziel dieser Mutation war es, im Vergleich zum Wildtyp drei Aminosäure-Austausche vorzunehmen: Arginin (R) in Position 38 soll gegen Leucin (L) ausgetauscht werden (R38L), Lysin (K) in Position 45 gegen Isoleucin (I) (K45I) und Alanin (A) in Position 9 gegen Glycin (G) (A9G). Mutante 1 kann also im Vergleich zum Wildtyp folgendermaßen beschrieben werden kann: A9G, R38L, K45I.

# A) Methode der Mutagenese:

Ein wesentlicher methodischer Schritt bei der Herstellung der Mutanten stellt die PCR (Polymerase chain reaction) zur Vermehrung von DNA dar. Ausgangspunkt ist die DNA-Replikation durch DNA-Polymerasen, die anhand eines vorgegebenen Templats dieses in einem 1. Schritt einfach verdoppeln. Durch Zyklisierung dieses einfachen Schrittes wird jedes neu erzeugte und jedes alte Templat wieder Vorlage für die DNA-Replikation. Dadurch wird eine Vermehrung im exponentiellen Maßstab bewirkt (2<sup>n</sup>).

Jeder einzelne Zyklus einer PCR besteht aus 3 Schritten, einem Denaturierungsschritt bei 94-96°C, wo die doppelsträngige DNA in den einzelsträngigen Zustand versetzt wird, einem Annealingschritt bei wählbarer Temperatur, wo sogenannte Primer an die jetzt einzelsträngige DNA binden können, und einem Polymeraseschritt bei 72°C (dem gängigen Temperaturoptimum thermophilen Polymerasen), wo diese Polymerasen an die Primer binden und den Einzelstrang der DNA wieder zu einem Doppelstrang vervollständigen. Da es sich hierbei um doppelsträngige DNA handelt, müssen Primer für beide Stränge, den sense und den antisense Strang, zugegeben werden. Diese Primer werden entsprechend sense und antisense Primer genannt. Als Annealingtemperatur wird bei allen Fusions-PCR-Schritten 52°C verwendet, bei den anderen PCR-Schritten bei der Herstellung der Mutanten 1 und 2 eine Temperatur von 52°C und den Mutanten 1/1 und 2/2 ein von 56°C.

Diese 3 Schritte sind beliebig oft wiederholbar, sodaß in ein und demselben Reaktionsgefäß die gleichen 3 Schritte in dieser Reihenfolge an der stetig wachsenden Zahl der vorliegenden und neu erzeugten Template durchgeführt werden.

Die im 2. Schritt erwähnten Primer sind notwendig für das richtige Ansetzen der Polymerase und setzen auch die Spezifität der PCR fest. Durch die vorgegebene Primersequenz werden die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert. Primer können jedoch nur an die Ziel-DNA binden, wenn sie eine mehr oder minder komplementäre Sequenz in der Ziel-DNA vorfinden. Die komplemetäre Bindungskapazität wird einerseits durch die Sequenzhomologie und andererseits durch die Annealingtemperatur des 2. Schritts festgelegt, wobei die Annealingtemperatur aus der Schmelztemperatur des Primers resultiert.

Die PCR wurde in dem vorliegenden Fall für die Generierung der einzelnen Cofaktormutanten eingesetzt. Dabei wurden die Punktmutationen an der Ziel-DNA durch die Verwendung solcher Primer eingeführt, d.h. die Primer zeigten in einzelnen Basen nicht die korrekte Homologie zur DNA-Sequenz. Da jedoch die Homologie der Primer trotz Punktmutationen noch 94% betrug, war eine Durchführung der PCR möglich (bei einer Basenlänge der Primer von durchschnittlich 33 Basen wurden 2 Basen ausgetauscht).

Die Punktmutationen müssen für eine korrekte Änderung der Zielsequenz auf beiden Strängen der doppelsträngigen DNA eingefügt werden. Das bedeutet, das für die Einführung einer Punktmutation im Gen zwei einzelne PCR-Reaktionen benötigt werden. In einer Reaktion wird vom 5 Ende des Gens (sense-Primer) bis zur Mutation (antisense-Primer) eine PCR durchgeführt, in der 2. Reaktion wird von der Mutation (sense-Primer) bis zum 3 Ende des Gens (antisense-Primer) eine PCR durchgeführt.

Sollen mehrere Punktmutationen eingeführt werden, deren Abstände zueinander die endliche Länge eines Primers (40-60 Basen) überschreiten, muß für jede Punktmutation die oben angeführten 2 PCR-Reaktionen gesondert durchgeführt werden.

Sind nun solche Punktmutationen durch PCR eingeführt worden, liegt in der Regel kein komplettes Gen vor, sondern die aus den Einzelreaktionen hervorgegangenen Teilstücke des Gens, das 5 Ende bis zur Mutation und das Stück von der Mutation bis zum 3 Ende. Diese müssen durch eine sogenannte Fusions-PCR zu einem kompletten Gen fusioniert werden.

#### **Fusions-PCR**:

Das Prinzip dieser PCR entspricht der oben beschriebenen, nur werden in diesem Fall 2 verschiedene Template zugegeben, die aber in dem Mutationsbereich eine 100% Homologie aufweisen, und zwar für die Länge des vorher eingesetzten Mutationsprimer (in der Regel ca. 30-40 Basen). Dieser Mutationsbereich fungiert durch seine Homologie als ein Primer der PCR, d.h. nach Denaturierung der DNA in die Einzelstränge können sich im darauffolgenden Annealingschritt die beiden Ausgangsstränge wieder zusammen finden, aber auch die beiden verschiedenen Stränge in dem Homologiebereich paaren. Die Polymerase kann dann von dem Mutationsbereich als dem Primer die restliche DNA wieder zu einem Doppelstrang vervollständigen. Um nur diese Variante als Möglichkeit zuzulassen, werden bei der Fusions-PCR in den ersten 5- 10 Cyclen keine genspezifischen Primer zugegeben.

Nach 5-10 Zyklen liegt genügend vervollständigte Gen-DNA zur Verfügung, so daß dann nach Zugabe der 5'und 3'Primer des Gens dieses zur Amplifikation in den folgenden Zyklen gebracht wird. Die vorher zugegebenen Genstücke können nicht amplifiziert werden, da für jedes Genteilstück immer nur ein Primer zur Verfügung steht (entweder nur der sense oder nur der antisense). Nur das in den ersten Zyklen komplettierte Gen kann mit beiden Primern amplifiziert werden.

Die erste nach dieser Methode erzeugte Mutante enthält im Vergleich zum Wildtyp-Enzym drei Aminosäure-Austausche: Arginin (R) in Position 38 wurde gegen Leucin (L) ausgetauscht (R38L), Lysin (K) in Position 45 gegen Isoleucin (I) (K45I) und (nicht erfindungsspezifisch) zusätzlich Alanin (A) in Position 9 gegen Glycin (G) (A9G). Dazu wurde im einzelnen folgendermaßen vorgegangen:

Als Templat für die Herstellung der Punktmutationsfragmente diente rekombinantes Plasmid [recADHpkk-177-3H], aus dem durch Restriktionsanalyse über Restriktions-Endonucleasen Eco R1 und Hind III das ADH-Gen (recADH) ausgeschnitten wurde. Das ausgeschnittene Fragment wurde nach Reinigung über ein Agarosegel in die PCR eingesetzt. Als Primer für die Mutante 1 dienten:

R38LK46I: acc ggc ctg cac agc gat gtt ggt gaa ata gca gct (36 bp) (5'-Primer sense) und

BRAS: gcgc aag ctt cta cta ttg agc agt gta gcc acc gtc aac tac aaa ttc aga (3'-Primer antisense), die das große Fragment B ergeben; sowie

BRS: gcgc gaa ttc atg tct aac cgt ttg gat ggt (5'-Primer sense) und R38LK46Irev:agc tgc tat ttc acc aac atc gct gtg cag gcc ggt (3'-Primer antisense), die das kleine Fragment A ergeben.

Alle Primer sind stets in 5'→ 3'-Leserichtung aufgeführt, die Primer BRS und BRAS entsprechen den 5'bzw. 3'Enden des recADH Gens. Die Komponenten und die jeweils verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: PCR-Ansätze (NTP=je 0,2 mM von dTTP, dATP, dCTP und dGTP; Puffer (Stammlösung) = 100 mM Tris/HCl pH 8,8; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 1% Triton X-100 (v/v); Taq=Thermus aquaticus-Polymerase). Die Erläuterungen der Abkürzungen gelten für alle fogenden Tabelle mit PCR-Ansätzen.

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
1	гесАDН;	100 pmol	100 pmol	0.2	10μ1	l μl
	100 ng	R38LK46I	BRAS			
2	recADH;	100 pmol BRS	`100 pmol	0.2	10 μ1	1 μ1
	100 ng		R38LK46Irev			·

Je nach Volumina der einzelnen Substanzen wird der Reaktionsansatz mit Wasser auf 100 µl ergänzt, das gilt im folgenden für alle PCR-Ansätze.

Die PCR-Fragmente wurden aufgereinigt und durch den überlappenden Teil in der Fusions-PCR (Tabelle 3) zu dem kompletten Gen mit den enthaltenden Punktmutationen zusammengefügt.

Tabelle 3: PCR-Ansatz (Abkürzungen s. Tab. 2):

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
3	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol	0,2	10µl	1 μ1
	PCR 1 und 2		BRAS			

Die Fragmentmengen sind abhängig von der Größe der Fragmente, es müssen für die Fusions-PCR gleiche pmol-Mengen an freien Enden der Fragmente vorhanden sein, d.h. bei gleicher Konzentration in ng haben kleinere Fragmente eine höhere Anzahl an pmol Enden als größere Fragmente. Für Mutante 1 ist das Verhältnis 1: 4,4 (kleines zu großes Fragment), d.h. von dem kleinen muß 4,4 mal weniger eingesetzt werden als von dem großen.

11

Einführung der dritten Mutation A9G:

A9G: ggt aag gta gga atc att aca (5 Primer) und BRAS: (3 Primer), die das große Fragment ergeben. BRS: (5 Primer) und A9Grev: tgt aat gat tcc tac ctt acc (3 Primer), die das kleine Fragment ergeben (Komponenten und Konzentrationene siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: PCR-Ansätze (Abkürzungen s. Tab. 2):

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
4	Produkt aus 3;	100 pmol A9G	100 pmol	0,2	10µl	1 μl
	100ng		BRAS			
5	Produkt aus 3;	100 pmol BRS	100 pmol	0,2	10 μl	1 μl
	100 ng		A9Grev			

Die aus der PCR entstandenden amplifizierten Fragmente werden erneut über Fusions-PCR zusammengefügt (Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
6	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol	0,2	10µl	1 μl
	PCR 4 und 5		BRAS			

Die Fragmente wurden im Verhältnis von 1:14.5 eingesetzt (klein zu groß). Das Produkt aus dieser PCR stellt die Mutante 1 dar, es wurde nach Reinigung in den Expressionsvektor pkk-177-3H kloniert und in E.coli HB101+ (pUBS520) überexprimiert. Das mutierte Genstück kann selbstverständlich auch in andere Vektoren als den pkk-177-3H eingefügt werden, beispielsweise pBTac (Fa. Boehringer Mannheim), pKK-233 (Fa. Stratagene) oder pET (Fa. Novagen). Ebenso können als Wirtsorganismus andere E. coli-Stämme als HB101+ (pUBS520) verwendet werden wie E. coli NM 522, E. coli RR1, E. coli DH5α oder E. coli TOP 10, die von öffentlichen Stammsammlungen oder Vektor-vertreibenden Firmen erhältlich sind.

# B) Enzymgewinnung:

# Zellvermehrung:

Zellmasse für die Aufarbeitung der einzelnen Mutanten wurde immer durch 5 L Schüttelkolbenfermentation produziert, als Wirt für die mutierten recADH Plasmide diente immer der HB101+ Stamm, d.h. man benötigt für die Anzucht doppelten Selektionsdruck durch Ampicillin und Neomycin. Nach Anzucht in Flüssigkultur (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; pH 7,5) bei 37°C bis zu einer OD550 von 0.5 wurde das Enzym dann durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 h Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet, und die Genexpression nach Zellaufschluß durch Aktivitätsnachweis und SDS-PAGE der Proteine überprüft. Alternativ können die durch Fermentation gewonnenen Zellen auch bei -20°C eingefroren gelagert werden.

# Zellaufschluß durch Ultraschall:

Zur Freisetzung des Enzyms können Standard-Aufschlußmethoden angewandt werden. In diesem Fall wurden die rekombinanten Organismen durch gepulsten Ultraschall aufgeschlossen. Die in Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendierten Zellen wurden einem Aufschluß mit 2 x 25 sec Zyklen mit 30 sec Intervall zur Kühlung am Pulsed Sonifier (Fa. Branson) mit 25 % Intensität unterzogen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, er wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

Wie die nachfolgenden Charakterisierungen zeigen werden, ist dieses mutierte Enzym (Mutante 1), gerade im Vergleich zur Enzymmutante 2, relativ stabil.

#### Aufreinigung der Enzymmutante 1:

Zur Gewinnung von gereinigtem Enzym wurden Standardverfahren der Proteinreinigung verwendet. Eingesetzt wurden 3 Reinigungsschritte durch Chromatographie an Phenylsepharose 6 FF, Q-Sepharose FF und Octylsepharose FF (alles kommerziell erhältliche produkte der Fa. Pharmacia, Freiburg). Tabelle 6 faßt die Aktivitäten und Ausbeuten der Reinigungsschritte zusammen.

Tabelle 6: Aufreinigung der Mutante 1:

Reinigungsschritt	Aktivität	spez. Aktivität	Ausbeute	Reinigungs-	Gesamtaktivität
	[U/ml]	[U/mg]	[%]	Faktor	[U]
Rohextrakt	13	0,9	100	1,0	390
Phenylsepharose	13	7,4	69	8,5	269
Q-Sepharose	71	25,0	64	29,0	252
Octylsepharose	53	53,0	20	62,0	80

# C) Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Charakterisierung der ADH-Mutante 1 bezüglich der kinetischen Daten ergab folgende, in Tabelle 7 zusammengefaßte Werte.

Tabelle 7: Kinetische Daten für die Enzymmutante 1.

Parameter	K <sub>M</sub> -Wert [mM]	k <sub>cat</sub> -Wert [sec <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> ]
NADP⁺	0,254	114,8	451
$NAD^{+}$	1,823	79,8	44
NADPH	0,149	156,0	1046
NADH	0,179	17,7	99

Im Vergleich zum Wildtyp ist bei dieser Mutante 1 bereits eine deutliche Verbesserung in der Reaktivität gegenüber dem Coenzym NAD<sup>+</sup> eingetreten: Der K<sub>M</sub>-Wert hat sich signifikant von 2,9 auf 1,8 mM verringert, gleichzeitig hat sich die Aktivität (k<sub>cat</sub>) von 21 auf nahezu 80 erhöht. Beide Verbesserungen zusammengenommen zeigen, daß diese Mutante NAD<sup>+</sup> bereits deutlich besser akzeptiert. Während die Selektivität (k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>) des Wildtyps für NAD<sup>+</sup> im Vergleich zu NADP<sup>+</sup> bei nur ca. 2,5% liegt, ist dieser Wert bei der Mutante 1 auf ca. 10% angestiegen.

#### D) Temperaturoptimum und -stabilität

Das Temperaturoptimum wurde für Reduktionsreaktionen bei pH 7,0 mit den beiden Coenzymen NADH und NADPH aufgenommen. Es liegt in beiden Fällen bei 55°C. Die Temperaturstabilität wurde als Restaktivität nach 25 h Inkubation bei verschiedenen

Temperaturen bestimmt. Bei 37°C wurden dabei noch 95 % Restaktivität erhalten, bei 42°C noch 34%.

# E) pH-Optimum und -stabilität

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden folgende Puffer verwendet:

pH 4,6 = Na-Acetat; pH 5,0 und 5,5 = Na-Acetat; pH 6,0 und 6,5 = Kpi oder MES; pH 7,0 und 7,5 = Kpi oder TEA; pH 8,0 und 8,5 = Tris; pH 9,0 = Bicine. Alle Puffer wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Zur Bestimmung der Reduktionsreaktion wurde 10 mM Acetophenon zugesetzt und für die Oxidation 25 mM Phenylethanol. Die Konzentration an NADP/NAD betrug jeweils 2 mM. Die Konzentration an NADH/NADPH betrug je 0,25 mM. Für die Messung wurden 970 μl der jeweiligen Pufferlösung, die bereits mit Substrat in der richtigen Konzentration versetzt war, mit 20 μl der Stammlösung an dem gewünschten Coenzym gemischt. Die Reaktion wurde mit 10 μl Enzym gestartet, je nach Aktivität unverdünnt oder so verdünnt, so daß die Aktivität bei der Messung zwischen 1 und 3 U/ml lag.

Das pH-Optimum der Mutante für die Reduktions-Reaktionen liegt sowohl bei Verwendung von NADH als auch mit NADPH im relativ sauren Bereich zwischen 5,0 und 6,0. Bei pH 7,5 wurden dazu im Vergleich nur noch 4% Aktivität gemessen. Für die Oxidations-Reaktionen mit NAD und NADP erhält man maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 7,0.

Die pH-Stabilität wird als Restaktivität nach 25-stündiger Inkubation bei verschiedenen pH-Werten ausgedrückt, wobei die gleichen Puffer wie zur Bestimmung des pH-Optimums verwendet wurden. 45 µl des jeweiligen Puffers wurden mit 5 µl der Enzymlösung gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Probenahmen erfolgten nach 30 min, 60 min, 6 h und 25 h.

Bei Mutante 1 erhielt man die höchste Restaktivität (100%) bei Lagerung bei pH 5,0. Bereits ein pH von 5,5 resultiert in nur noch 80% Restaktivität und pH 7,0 ergibt nur noch 34 % Aktivität nach 25 h.

# F) Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrische Punkt liegt nach Bestimmung mit isoelektrischer Fokussierung (IEF) bei pH 4,28. Das ist gerade im Vergleich zur Mutante 2 (s. Beispiel 4) bemerkenswert. Bei Mutante 2 liegt der IP bei 4,65, obwohl in beiden Mutanten jeweils ein Lysin ausgetauscht wurde: bei Mutante 1 das Lysin-45 (in Isoleucin) und bei Mutante 2 das Lysin-48 (in Methionin).

G) Reduktion von Acetophenon im Batch unter Coenzym-Regenerierung und Bestimmung der Enantioselektivität dieser Umsetzung

Im Batch-Ansatz zur Reduktion von Acetophenon unter Coenzym-Regenerierung mit Isopropanol wurde eine vollständige Umsetzung zu Phenylethanol erreicht, eingesetzt wurden dazu 960 µl Triethanolamin-Puffer, 50 mM pH 7,0 mit 11 mM Acetophenon; 10 µl Magnesiumchlorid (100 mM Stammlösung); 25 µl NADP<sup>+</sup> (10 mM Stammlösung); 9,4 µl Isopropanol; 1 U Alkohol-Dehydrogenase. Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels Gaschromatographie in einer Probe nach vollständigem Umsatz (4 h) zeigt, daß nur der (R)-Alkohol erhalten wurde, (S)-Phenylethanol war nicht nachweisbar.

#### Beispiel 2:

## Herstellung und Charakterisierung der Mutante 1/1 (A9G, R38L, K45M):

Ziel dieser Mutation war es, im Vergleich zu Mutante 1 das Lysin in Position 45 in Methionin an Stelle von Isoleucin (Mutante 1) auszutauschen. Die übrigen in Mutante 1 vorgenommenen Austausche in Position 9 und 38 sind beibehalten worden, so daß Mutante 1/1 im Vergleich zum Wildtyp folgendermaßen beschrieben werden kann: A9G, R38L, K45M.

#### A) Gewinnung von Mutante 1/1:

Zur Gewinnung von Mutante 1/1 wurden prinzipiell die gleichen Methoden wie in Beispiel 1 beschrieben verwendet. Da die Mutante 1/1 ist eine Erweiterung der Mutante 1, daher wird als Templat für die nachfolgende PCR die Mutante 1 verwendet. R38LK45M: acc ggc ctg cac agc gat gtt gaa atg gca (5'Primer) und BRAS (3'Primer), die das große Fragment ergeben.

BRS (5'Primer) und R38LK45Mrev: tgc cat ttc acc aac atc gct gtg cag gcc ggt (3'Primer), die das kleine Fragment ergeben.

Tabelle 8: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
7	Produkt aus 6;	100 pmol	100 pmol BRAS	0,2	10μl	1 µl
	100 ng	R38LK45M				
8	Produkt aus 6;	100 pmol BRS	100 pmol	0,2	10 μ1	1 μl
	100 ng		R38LK45Mrev			·

Die Fragmente wurden aufgereinigt und in die Fusions-PCR eingesetzt.

Tabelle 9: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
9	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol BRAS	0,2	10μl	1 μl
	PCR 7 und 8					

Die Fragmente wurden im Verhältnis 1:4.4 in die PCR eingesetzt. Das Produkt stellt die Mutante 1/1 dar, da ja aus Mutante 1 die Mutation A9G übernommen wurde.

Wie bei Mutante 1 wurde auch hier die eingeführten Mutationen durch Sequenzierung des Gens bestätigt. Zur Gewinnung der Enzymmutante wurde das Gen dann in E.coli HB101+ (pUBS520) überexprimiert.

# B) Enzymgewinnung:

Fermentation und Zellaufschluß entsprechen der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise.

Aufreinigung der Enzymmutante 1/1:

Die Aufreinigung dieses mutierten Enzyms entspricht der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Tabelle 10 faßt die charakteristischen Daten zusammen.

Tabelle 10: Aufreinigung der Enzymmutante 1/1:

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Faktor	Gesamtaktivität [U]
Rohextrakt	178	14	100	1	2470
Phenylsepharose	137	81	64	6	1576
Q-Sepharose	179	75	29	6	716
Octylsepharose	140	100	11	7	280

C) Bestimmung der kinetischen Parameter für die Enzymmutante 1/1: Die Charakterisierung der ADH-Mutante 1/1 bezüglich der kinetischen Daten für die Coenzyme ergab die folgenden in Tabelle 11 zusammengestellten Werte.

Tabelle 11: Kinetische Daten für die oxidierten und reduzierten Coenzyme für die Enzymmutante 1/1.

Parameter	K <sub>M</sub> -Wert [mM]	k <sub>cat</sub> -Wert [sec <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_{M}$ [mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> ]
NADP⁺	0,502	33,3	66
$NAD^{+}$	0,502	33,3	66
NADPH	0,352	166,4	473
NADH	0,188	10,3	55

Die kinetischen Daten zeigen, daß diese Mutante das Coenzym NAD<sup>+</sup> genauso gut akzeptiert wie NADP<sup>+</sup>. Der K<sub>M</sub>-Wert für NAD<sup>+</sup> hat sich signifikant erniedrigt, er liegt bei 0,5 mM an Stelle von 2,9 für den Wildtyp. Diese Mutante zeigt also bereits eine besonders gute, niedrige Affinität zum Coenzym NAD<sup>+</sup>. Auch der k<sub>cat</sub>-Wert hat sich leicht verbessert, er liegt bei 33,3 sec <sup>-1</sup>. Der Vergleich der Selektivitäten (k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>) für beide Coenzyme zeigt für NAD<sup>+</sup> denselben Wert von 66 mM<sup>-1</sup>·sec<sup>-1</sup> wie für NADP<sup>+</sup>.

Im Vergleich zum Wildtyp, der NAD<sup>+</sup> zu ca. 2,5% bezogen auf NADP<sup>+</sup> umsetzt, wird NAD<sup>+</sup> von dieser Mutante mit 100% umgesetzt.

# D) Temperaturoptimum und -stabilität

Das Temperaturoptimum für die Enzymmutante 1/1 liegt mit NADPH gemessen bei mindestens 65°C, höhere Temperaturen wurden meßtechnisch bedingt nicht erreicht. Wird das Temperaturoptimum mit dem Coenzym NADH bestimmt, findet man einen optimalen Wert bei 40°C. Vermutlich wird NADH bei höheren Temperaturen nicht mehr so gut am Enzym gebunden, so daß dann nur noch verminderte Aktivität nachweisbar ist. Die Messung zur Temperaturstabilität zeigt, daß nach 25 Std. nur bei 25°C noch 100% Restaktivität nachweisbar ist, bei 30°C nur noch 59%. Die Temperaturstabilität der Mutante 1/1 hat sich im Vergleich zum Wildtyp-Enzym also signifikant verschlechtert.

# E) pH-Optimum und -stabilität

Das pH-Optimum für die Reduktionsrichtung (Messung mit Acetophenon) liegt sowohl mit NADPH als auch mit NADH gemessen bei ca. 6,0. Für die Oxidation liegt das Optimum bei 7,0 (NADP<sup>+</sup>) bzw. 7,5 (NAD<sup>+</sup>).

F) Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrischen Punkts der Enzymmutante 1/1 liegt bei 4,85.

G) Reduktion von Acetophenon im Batch unter Coenzym-Regenerierung und Bestimmung der Enantioselektivität dieser Umsetzung

Die Reduktion von Acetophenon unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen ergab nur das (R)-Isomere von Phenylethanol.

19

# Beispiel 3:

# Herstellung und Charakterisierung der Mutante 2 (A9G, R38L, K48M):

Ziel dieser Mutation war es, im Vergleich zu Mutante 1 das Lysin in Position 48 durch Methionin auszutauschen - an Stelle des K45I-Austauschs. Die übrigen in Mutante 1 vorgenommenen Austausche in Position 9 und 38 sind beibehalten worden, so daß Mutante 2 im Vergleich zum Wildtyp folgendermaßen beschrieben werden kann: A9G, R38L, K48M.

# A) Methode der Mutagenese:

Zur Gewinnung von Mutante 2 wurden prinzipiell die gleichen Methoden wie in Beispiel 1 beschrieben verwendet. Da die Mutante 2 unabhängig von Mutante 1 hergestellt wurde, wurde hier wieder das Gen der Wildtyp-ADH (recADH) als Templat eingesetzt.

R38LK48M: acc ggc ctg cac agc gat gtt ggt gaa aaa gca gct atg agt gtc (5 Primer) und BRAS (3 Primer), die das große Fragment ergeben;

BRS (5 Primer) und

R38LK48Mrev: gac act cat age tgc ttt ttc acc aac atc gct gtg cag gcc ggt (3 Primer), die das kleine Fragment ergeben.

Tabelle 12: PCR-Ansätze

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
13	гесADH;	100 pmol	100 pmol BRAS	0.2	10μ1	l μl
	100ng	R38LK48M				
14	recADH;	100 pmol BRS	100 pmol R38LK48Mrev	0.2	10 μl	1 μl
	100 ng					

Die Fragmente wurden aufgereinigt und in die Fusions-PCR eingesetzt.

Tabelle 13: PCR-Ansatz

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
15	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol BRAS	0.2	10µl	1 μl
	PCR 13 und 14		·			

Die Fragmente wurden in einem Verhältnis von 1:4.4 eingesetzt, das Produkt dieser Fusions-PCR ist ein Zwischenprodukt der Mutante 2, da die Mutation A9G noch eingefügt werden muß.

Einführung der dritten Mutation A9G:

A9G: ggt aag gta gga atc att aca (5'Primer) und BRAS: (3'Primer), die das große Fragment ergeben;

BRS: (5 Primer) und A9Grev: tgt aat gat tcc tac ctt acc (3 Primer), die das kleine Fragment ergeben (Tabelle 18).

Tabelle 14: PCR-Ansätze

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
16	Produkt aus 15;	100 pmol A9G	100 pmol BRAS	0.2	10μ1	l μl
	100ng	-	•			
17	Produkt aus 15;	100 pmol BRS	100 pmol A9Grev	0.2	10 μl	1 μl
	100 ng		•			

Die Fragmente wurden im Verhältnis 1:14.5 in die Fusions-PCR (Tabelle 19) eingesetzt.

Tabelle 15: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
18	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol BRAS	0.2	10μl	1 μl
	PCR 16 und 17					

Das Produkt dieser Fusions-PCR stellt die Mutante 2 dar, diese wurde wie alle anderen Mutanten in den Expressionsvektor pkk-177-3H einkloniert. Zur Gewinnung der Enzymmutante wurde das Gen dann in E.coli HB101+ (pUBS520) überexprimiert.

# B) Enzymgewinnung:

Fermentation und Zellaufschluß:

Fermentation, Zellaufschluß und Enzymreinigung entsprechen der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise. Tabelle 20 faßt die charakteristischen Daten der Reinigung zusammen.

Tabelle 16: Aufreinigung der Enzymmutante 2:

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute	Faktor	Aktivität gesamt
Rohextrakt	310	18	100	1	3300
Hitzefällung	330	35	100	2	3300
Phenylsepharose	73	91	11	5	364
Q-Sepharose	90	65	8,2		270

C) Bestimmung der kinetischen Parameter für die Enzymmutante 2: Die Charakterisierung der ADH-Mutante 2 bezüglich der kinetischen Daten für die Coenzyme ergab die folgenden in Tabelle 21 zusammengestellten Werte.

Tabelle 17: Kinetische Daten für die oxidierten Coenzyme für die Enzymmutante 2.

Parameter	K <sub>M</sub> -Wert [mM]	k <sub>cat</sub> -Wert [sec <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_{M}$ [mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> ]
NADP <sup>+</sup>	6,155	47,0	8
NAD⁺	0,619	33,1	54

Bei dieser Mutante haben sich im Vergleich zum Wildtyp beide Parameter vorteilhaft bezüglich NAD<sup>+</sup> verändert, der KM-Wert ist von 2,9 auf 0,62 mM gesunken, der kcat-Wert hat sich von 21 auf 33 verbessert. Damit hat sich der k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>-Wert von 7,3 auf 54 verbessert. Gleichzeitig haben sich bei dieser Mutante vor allem Affinität zu NADP<sup>+</sup> (KM-Wert), aber auch der k<sub>cat</sub>-Wert drastisch verschlechtert, so daß diese Mutante bevorzugt NAD<sup>+</sup> als Coenzym verwendet.

# D) Temperaturoptimum und -stabilität

Das Temperaturoptimum liegt deutlich niedriger als beim Wildtyp-Enzym, mit NADP gemessen liegt es bei 50°C, mit NAD<sup>+</sup> bei 33-37°C. Die Temperaturstabilität zeigt, daß nach 25 h nur bei 25°C noch 100% Restaktivität vorhanden sind, bei 30°C nur noch 40%.

# E) pH-Optimum und -stabilität

Das pH-Optimum für die Reduktion von Acetophenon liegt mit NADPH gemessen bei 8,0, mit NADH gemessen dagegen bei 6,5. Dieses Optimum bei 6,5 entspricht dem Wildtyp-Enzym, gemessen mit NADPH. Vergleichbar mit dem Wildtyp-Enzym zeigt auch die mit NADH gemessene Aktivität nur einen schmalen Aktivitätsbereich, bei pH 7,0 findet man nur noch 46% Restaktivität. Die Stabilität der Enzymmutante bei verschiedenen pH-Werten nach 25 h zeigt ein Maximum bei pH 7,0, bei pH 6,0 wie auch bei 8,0 wurden noch 84% Restaktivität gemessen.

F) Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrische Punkt der Enzymmutante liegt bei pH 4,65.

G) Reduktion von Acetophenon im Batch unter Coenzym-Regenerierung und Bestimmung der Enantioselektivität dieser Umsetzung

Die Reduktion von Acetophenon unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen ergab nur das (R)-Isomere von Phenylethanol.

#### Beispiel 4:

Herstellung und Charakterisierung der Mutante 2/2 (A9G, R38L, H39L, K48M): Ziel dieser Mutation war es, im Vergleich zu Mutante 2 noch zusätzlich einen weiteren Aminosäure-Austausch einzuführen, indem die basische Aminosäure Histidin in Position 39 gegen eine neutrale Aminosäure, das Leucin, ausgetauscht wurde. Die Mutante 2/2 kann also in Bezug auf den Wildtyp folgendermaßen beschrieben werden: A9G, R38L, H39L, K48M.

# A) Methode der Mutagenese:

Zur Gewinnung von Mutante 2/2 wurden prinzipiell die gleichen Methoden wie in Beispiel 1 beschrieben verwendet. Da die Mutante 2/2 eine Folgemutante der Mutante 2 darstellt, wurde diese als Templat für die PCR eingesetzt.

R38LH39L: acc ggc ctg ctc agc gat gtt (5 Primer) und
BRAS (3 Primer), die das große Fragment ergeben;
BRS (5 Primer) und R38LH39Lrev: aac atc gct gag cag gcc ggt (3 Primer), die das kleine Fragment ergeben.

Tabelle 18: PCR-Ansätze

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
19	Produkt aus 18;	100 pmol	100 pmol	0.2	10μ1	l μl
	100ng	R38LH39L	BRAS			
20	Produkt aus 18;	100 pmol BRS	100 pmol	0.2	10 μΙ	1 µl
	100 ng		R38LH39Lrev			

Die Fragmente wurden aufgereinigt und in die Fusions-PCR eingesetzt, in einem Verhältnis von 1:4.4 (klein zu groß).

Tabelle 19: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
21	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol BRAS	0.2	10μl	l μl
	PCR 19 und 20					

Das Produkt dieser Fusions-PCR stellt die komplette Mutante 2/2 dar, die Mutationen K48M und A9G wurden aus der Mutante 2 übernommen. Zur Gewinnung der Enzymmutante wurde das Gen dann in E.coli HB101+ (pUBS520) überexprimiert.

# B) Enzymgewinnung:

Fermentation, Zellaufschluß und Aufreinigung der Enzymmutante 2/2:

Die Enzymproduktion und Aufreinigung dieses mutierten Enzyms entspricht der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Tabelle 24 faßt die charakteristischen Daten der Enzymreinigung zusammen.

Tabelle 20: Reinigung der Enzymmutante 2/2

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute [%]	Faktor	Gesamtakt. [U]
Rohextrakt	35	1.9	100	1	467
Hitzefällung	30	3	96	1.6	450
Phenylsepharose	72	26	98	14	457
Q-Sepharose	80	89	85	47	398
Octylsepharose	65	93	28	49	130

# C) Bestimmung der kinetischen Parameter für die Enzymmutante 2/2:

Die Charakterisierung der ADH-Mutante 2/2 bezüglich der kinetischen Daten ergab folgende in Tabelle 25 aufgeführte Werte:

Tabelle 21:

Parameter	K <sub>M</sub> -Wert [mM]	k <sub>cat</sub> -Wert [sec <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_{M}$ [mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> ]
NADP <sup>+</sup>	0,143	30,8	215
$NAD^{+}$	0,955	23,2	24
NADPH	0,370	101,1	273
NADH	0,070	33,6	479

Für NAD<sup>+</sup> hat sich im Vergleich zum Wildtyp-Enzym der K<sub>M</sub>-Wert von 2,9 auf 0,96 mM erniedrigt. Für NADP<sup>+</sup> haben sich K<sub>M</sub>- wie auch k<sub>cat</sub>-Wert leicht verschlechtert.

Auffallend ist die besonders gute Affinität der Mutante gegenüber NADH, der K<sub>M</sub>-Wert liegt bei 0,07 mM.

# D) Temperaturoptimum und -stabilität

Das Temperaturoptimum der Mutante 2/2, gemessen bei pH 5,0, liegt bei 42°C, gemessen mit NADPH und bei Verwendung von NADH bei 50oC. Diese Optima sind relativ breit, mit NADPH gemessen erhält man noch 95% Aktivität bei Messung bei 50°C, mit NADH gemessen bei 60°C noch 70%. Die Stabilität bei Lagerung (6h) bei verschiedenen Temperaturen ergibt für 30°C noch 67%, bei 37°C nur noch 7%.

# E) pH-Optimum und -stabilität

Das pH-Optimum liegt für die Reduktion von Actophenon mit NADPH bei 6,0, bei Verwendung von NADH bei 5,0. Gerade mit NADH ist diese Mutante eigentlich nur im sauren Bereich aktiv, bei pH 7,0 erhält man nur noch 6% Aktivität im Vergleich zum Wert bei 5,0. Auch für die Oxidation ist das Optimum signifikant leicht in den sauren Bereich verschoben, maximale Aktivität findet man sowohl mit NADP<sup>+</sup> als auch NAD<sup>+</sup> bei pH 7,5. Bei pH 8,0, dem Optimum des Wildtyps, findet man nur noch 77% (NADP<sup>+</sup>) bzw. 61% (NAD<sup>+</sup>) Aktivität. Wird das Enzym bei verschiedenen pH-Werten gelagert und die Restaktivität nach 6 h gemessen, findet man noch 100% Restaktivität bei pH 7,0. Bei pH 8,5 erhält man nur noch 58%.

- F) Bestimmung des isoelektrischen Punkts Der isoelektrische Punkt der Enzymmutante 2/2 liegt bei 4,47.
- G) Reduktion von Acetophenon im Batch unter Coenzym-Regenerierung und Bestimmung der Enantioselektivität dieser Umsetzung

  Die Reduktion von Acetophenon unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen ergab nur das (R)-Isomere von Phenylethanol.

Die Beispiele 1 bis 4 zeigen, daß die Basizitätsminderung im Coenzym-relevanten Aminosäure-Sequenzbereich des ADH-Proteins der NADP-bevorzugenden Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus brevis durch gentechnologisch erreichbaren

Austausch von basischen durch ungeladene Aminosäurereste wie R38L, H39L, K45I, K45M bzw. K48M in unterschiedlicher Kombination zu einer praxisrelevanten Verbesserung der NAD<sup>+</sup>-Spezifität des Enzyms führt.

Ein solcher Austausch basischer gegen ungeladene Aminosäurereste im coenzymsensiblen bzw. Coenzym-Andockbereich zur NAD<sup>+</sup>-Spezifitätsverbesserung ist natürlich analog bei anderen Dehydrogenasen bekannter oder noch zu bestimmender Aminosäure- und zugehöriger DNA-Sequenz möglich, wobei sich die coenzym-sensible Abwandlung – soweit der spezifische Bereich nicht bekannt ist – am Erfolg zu erkennen gibt.

So sind z.B. bei weiteren NADP-bevorzugenden Dehydrogenasen Aminosäure-Sequenzen bekannt und in Datenbanken recherchierbar, wobei zunächst am einfachsten im Ähnlichkeitsbereich eines bereits bekannten Coenzym-Bindungsmotivs gesucht werden kann.

Im vorliegenden Fall wurden aus einer Protein-Sequenz-Datenbank ("Swiss-Prot")
Enzyme gesucht, die Ähnlichkeiten mit der Sequenz der L. brevis ADH aufzeigen. Als
Suchmotiv wurde die Sequenz von Aminosäure-17 bis Aminosäure-50 der L. brevisADH eingegeben, das Suchprogramm ermittelt dann alle Proteine, die Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Das Programm (Referenz: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden,
Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J.
Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) kann auch Lücken einfügen,
um die Ähnlichkeit von Sequenzbereichen zu verdeutlichen, wobei angenommen wird,
daß es auch natürlicherweise durch Deletionen und Insertionen zu solchen Verschiebungen kommen kann.

Tab. 22 zeigt als Ergebnis einer solchen Recherche Aminosäure-Sequenzen im Ähnlichkeitsbereich bezogen auf Consensus-Sequenzen für NADP-abhängige Dehydrogenasen.

Dabei bedeuten "sp-Q93761" eine Oxidoreduktase aus Caenorhabditis elegans,
"sp-P50161" eine Versicolorin-Reductase aus Aspergillus parasiticus, "sp-O67610"

eine Oxidoreduktase aus Aquifex aeolicus, "sp-P42317" eine Oxidoreduktase aus Bacillus subtilis und "sp-Q49721" eine Oxidoreduktase aus Mycobacterium leprae.

Tab. 22: Vergleich von Sequenz-Bereichen in NADP-abhängigen Oxidoreduktasen, die der vermuteten Coenzym-Bindungsstelle der ADH aus Lactobacillus brevis (LBADH) entsprechen.

LBADH:	17 GIGLAIATKFVEEGAKVMIT <b>GR</b> HSDVG-E <b>K</b> AA <b>K</b> SV	
sp-Q93761:	37 GLGKAIATTFAHLGASVAIA <b>AR</b> RLDVL-E <b>KTADE</b> I	
sp-P50161:	20 GIGAAIAVALGERGAKVVVN <b>YA</b> HSREAAE <b>K</b> VV <b>E</b> QI	
sp-067610:	18 GIGRAIAEKLASAGSTVIIT <b>GT-</b> SGERA <b>-K</b> AV <b>A</b> EEI	
sp-P42317:	14 GIRFEIAREFAREGASVIVDLR-PEAC-EKAASKL	
sp-Q49721:	77 EGLI-GRHADVGA-KVAQLI	

Man erkennt analog zur ADH aus L. brevis basische Aminosäurereste in zum Teil analoger räumlicher Zuordnung, insbesondere etwa in der Position 45 und 38 von LB-ADH analoger Entfernung vom Consensus-Sequenzbereich. Der erfindungsgemäße Austausch gegen ungeladene Reste dürfte auch bei diesen bekannten Enzymen zu einer besseren NAD<sup>+</sup>-Akzeptanz führen.

In Weiterführung des detailliert beschriebenen Prinzips der Basizitätsänderung wurde nunmehr festgestellt, daß an Stelle des Austauschs basischer gegen ungeladene Aminosäurereste auch ein Wechsel von basischer oder von ungeladener Aminosäure zu negativ geladener Aminosäure mit positiver Wirkung für die NAD<sup>+</sup>-Akzeptanz vorgenommen werden kann. Die gewünschte Basizitätsminderung kann natürlich auch durch Mischformen solcher Austausche erzielt werden.

Das nachfolgende Beispiel 5 belegt den Nutzen einer solchen Einführung eines negativ geladenen Aminosäurerests zusätzlich zu Austauschen basischer durch neutrale Aminosäuren im Coenzym-sensiblen Bereich.

# Beispiel 5:

# Herstellung und Charakterisierung der Mutante2/3 (A9G, G37D, R38L, K48M):

Ziel dieser Mutation war es, im Vergleich zu Mutante 2 in eine Bindungsstelle für das Coenzym in der Region 37/38 eine saure Aminosäure einzufügen. Dazu wurde von der Mutante 2 ausgegangen, die bereits eine hohe Präferenz für NAD<sup>+</sup> gegenüber NADP<sup>+</sup> aufweist und in Position 37 das Glycin gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Die Mutante 2G37D kann also in Bezug auf den Wildtyp folgendermaßen beschrieben werden: A9G, G37D, R38L, K48M.

# A) Methode der Mutagenese:

Zur Gewinnung von Mutante 2/3 wurden prinzipiell die gleichen Methoden wie in den vorangehenden Beispielen angewandt. Da die Mutante 2/3 eine Folgemutante der Mutante 2 darstellt, wurde diese als Templat für die PCR eingesetzt.

G37DR38LK48M: 5'acc gac ctg cac agc gat gtt gtt gaa aaa gca gct atg agt gtc3'

(5'Primer) und

BRAS (3 Primer), die das große Fragment ergeben;

BRS (5 Primer) undG37DR38LK48M rev: 5'gac act cat age tge ttt tte ace aac ate get gtg cag gte ggt 3' (3 Primer), die das kleine Fragment ergeben.

Tabelle 23: PCR-Ansatz (Gesamt-Ansatz = 100 µl)

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP	Puffer	Taq
				[mM]		
A	Mutante2; 100 ng	100 pmol	100 pmol	0.2	10μ1	l μl
		G37DR38LK48M	BRAS			
В	Mutante2; 100 ng	100 pmol BRS	100 pmol	0.2	10 μΙ	lμl
			G37DR38LK48M			
			Rev			•

Die Fragmente wurden aufgereinigt und in die Fusions-PCR eingesetzt, in einem Verhältnis von 1:4.4 (klein zu groß).

Tabelle 24: PCR-Ansatz:

PCR	Templat	5'-Primer	3'-Primer	NTP [mM]	Puffer	Taq
<b>C</b> .	Fragmente aus	100 pmol BRS	100 pmol BRAS	0.2	10μ1	lμl
	PCR A und B					

Das Produkt dieser Fusions-PCR stellt die komplette Mutante 2/3 dar, die Mutationen R38L, K48M und A9G wurden aus der Mutante 2 übernommen. Zur Gewinnung der Enzymmutante wurde das Gen dann in E.coli HB101+ (pUBS520) überexprimiert. Die korrekte Mutagenese wurde durch Sequenzierung des positiven Klons verifiziert.

B) Enzymgewinnung und Aktivitätstest mit NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH und NADPH:

Fermentation, Zellaufschluß und Aufreinigung der Enzymmutante 2/3:

Die Vermehrung des E. coli-Stamms, der das durch Mutagenese veränderte Enzym enthält, wird wie in den Beispielen 1 bis 4 beschrieben durchgeführt.

Nach Aufschluß der Zellen und Abzentrifugation der Zellbruchstücke erhält man den enzymhaltigen Überstand (Rohextrakt).

Im Standard-Enzymtest für die Reduktion von Acetophenon wurden mit NADPH 0,032 U/mg (0,318 U/ml; 9,75 mg Protein/ml) und mit NADH 0,47 U/mg (4,61 U/ml; 9,75 mg Protein/ml) gemessen. In der Rückreaktion (Alkohol-Oxidation) mit Phenylethanol wurde mit NAD<sup>+</sup> eine spezifische Aktivität von 1,1 U/mg (10,8 U/ml; 9,75 mg Protein/ml) gemessen, mit NADP<sup>+</sup> zeigte dieses Enzympräparat keine Aktivität.

Durch die erfindungsgemäße Abwandlung der genetischen Information wurde also ein Enzym erhalten, das nur noch NAD<sup>+</sup> und kein NADP<sup>+</sup> mehr akzeptiert.

#### Anhang

Aminosäure-Sequenzen von Wildtyp- und mutierten ADHn aus Lactobacillus brevis im N-terminalen Bereich bis zur 50. Aminosäure (die Austausche in Bezug auf den Wildtyp sind durch Unterstreichung hervorgehoben):

# A) Wildtyp-Enzym:

S-N-R-L-D-G-K-V-A-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G-R-H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-K-S-V<sub>50</sub>

# B) Mutante 1:

S-N-R-L-D-G-K-V- $\underline{G}$ -I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G- $\underline{L}$ -H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E- $\underline{I}$ -A-K-S-V<sub>50</sub>

# C) Mutante 1/1:

 $S-N-R-L-D-G-K-V-\underline{G}-I_{10}-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L_{20}-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G_{30}-A-K-V-M-I-T-G-\underline{L}-H-S_{40}-D-V-G-E-\underline{M}-A-A-K-S-V_{50}$ 

#### D) Mutante 2:

S-N-R-L-D-G-K-V-<u>G</u>-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G-<u>L</u>-H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-<u>M</u>-S-V<sub>50</sub>

#### E) Mutante 2/2:

S-N-R-L-D-G-K-V-<u>G</u>-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G-<u>L</u>-<u>L</u>-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-<u>M</u>-S-V<sub>50</sub>

#### F) Mutante 2/3:

S-N-R-L-D-G-K-V-<u>G</u>-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-<u>D-L</u>-H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-<u>M</u>-S-V<sub>50</sub>

# Patentansprüche

- 1 Verfahren zur Verbesserung der NADH-Spezifität von bevorzugt NADPHabhängigen Dehydrogenasen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Basizität des Enzyms im Coenzym-Andockbereich durch angemessene Änderung der Aminosäure-Sequenz mit Hilfe gentechnologischer Mittel vermindert.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Basizität der Aminosäure-Sequenz der Dehydrogenase im Coenzym-Andockbereich durch Austausch positiv geladener Aminosäure(n) gegen ungeladene Aminosäure(n) vermindert.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Basizität der Aminosäure-Sequenz der Dehydrogenase im Coenzym-Andockbereich allein oder zusätzlich durch Austausch neutraler oder positiv geladener Aminosäure(n) gegen negativ geladene Aminosäure(n) vermindert.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Dehydrogenase mit für präparative Zwecke tauglicher NADH-Abhängigkeit entsprechend k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> für NAD<sup>+</sup> ≥ 20 auf gentechnologischem Wege erzeugt, indem man von einem NADPH-bevorzugenden Dehydrogenase-Produzentenstamm mit bekannter oder zu ermittelnder Aminosäure-Sequenz im Coenzym-Andockbereich ausgeht und für die gewünschte Basizitätsänderung eine entsprechende Veränderung der zugehöigen DNA-Sequenz mittels PCR-Technik vornimmt und die durch diese Methode veränderte genetische Information innerhalb des gewünschten Gens in einen geeigneten Vektor kloniert und anschließend in einem Dehydrogenase-produzierenden Mikroorganismus überexprimiert.
- 5. Verfahren nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch die Herstellung von short-chain Dehydrogenasen mit Coenzym-Bindungsstellen am N-Terminus.

PCT/DE99/00848

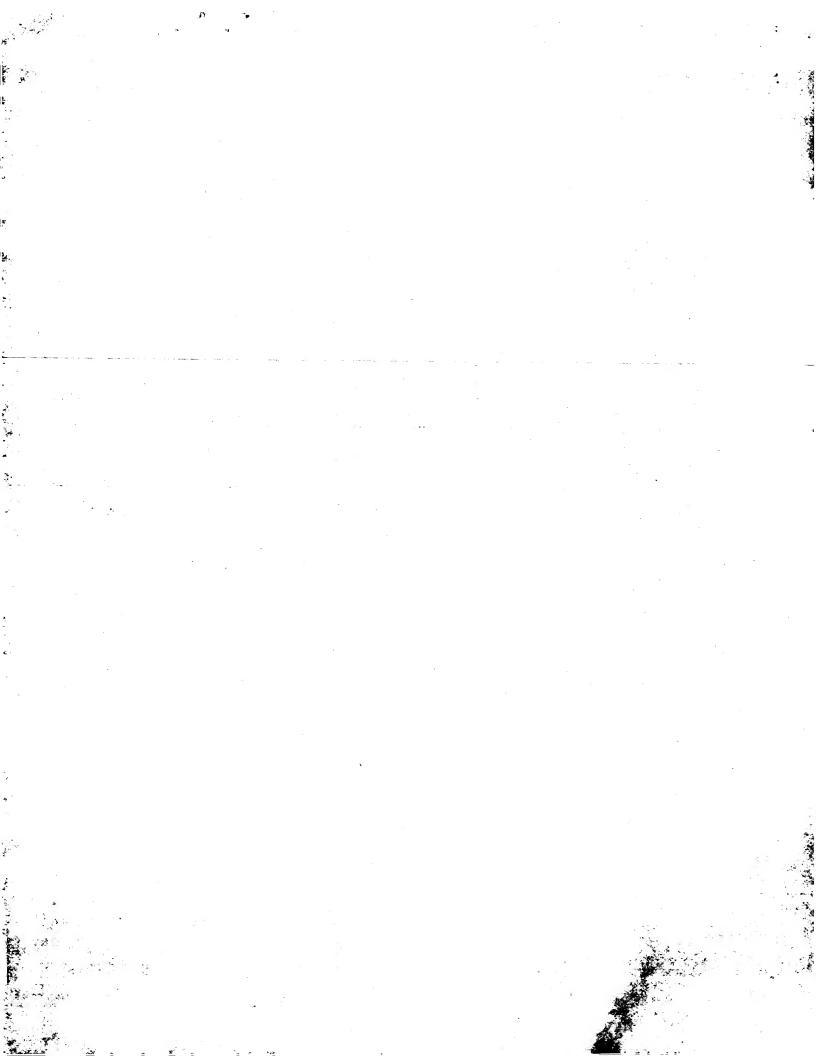
6. Verfahren nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch die Herstellung von Alkohol-Dehydrogenasen, insbesondere von (R)-spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen.

32

- 7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehydrogenase mit Hilfe von E. coli, insb. von E. coli HB101+(pUBS 520), gewonnen wird, der das für die gewünschte Dehydrogenase kodierende mutierte, in einem Expressionsplasmid, insb. pKK-117-3HB, klonierte Gen überexprimiert enthält.
- 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Alkohol-Dehydrogenase ausgehend von Lactobacillen, insbesondere von L.brevis oder L.kefir gewonnen wird.
- 9. Für präparative Zwecke taugliche (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase mit einem k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> für NAD<sup>+</sup> ≥ 20, erhältlich ausgehend von Lactobacillus-Stämmen, insb. von L. brevis oder L. kefir, mit einem für short-chain Dehydrogenasen mit Coenzym-Bindungsstelle im N-Terminus kodierenden Gen durch Abwandlung der entsprechenden Gen-Sequenz im Hinblick auf die gewünschte Basizitätsminderung an der Coenzym-Bindungsstelle druch Ersatz positiv geladener und / oder ungeladener Aminosäure(n) durch negativ geladene Aminosäuren und / oder Aminosäuren mit positiv geladenen Restgruppen durch Aminosäuren mit ungeladenen Restgruppen.
- 10. Alkohol-Dehydrogenase nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch zumindest einen G37D-, R38L-, H39L-, K45I-, K45M- und/oder K48M-Austausch bei der Alkohol-Dehydrogenase aus L.brevis im N-terminalen Sequenz-bereich, der unverändert S-N-R-L-D-G-K-V-A-I<sub>10</sub>-I-T-G-G-T-L-G-I-G-L<sub>20</sub>-A-I-A-T-K- F-V-E-E-G<sub>30</sub>-A-K-V-M-I-T-G-R-H-S<sub>40</sub>-D-V-G-E-K-A-A-K-S-V<sub>50</sub> lautet, insb. durch einen der folgenden Austausche
  - R38L, K45I;
  - R38L, K45M;
  - R38L, K48M;
  - R38L, H39L, K48M;
  - G37D, R38L, K48M.

WO 99/47684

- 11. Verfahren zur stereo-selektiven Gewinnung von (R)-Hydroxy-Verbindungen durch enzymatische Reduktion entsprechender Keto-Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzym eine nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erhältliche Dehydrogenase verwendet.
- 12. Verfahren zur stereo-selektiven Gewinnung von S-Hydroxy-Verbindungen aus Racematen durch enzymatische Oxidation der R-Hydroxy-Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzym eine nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erhältliche Dehydrogenase verwendet.



# PCT

#### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikati n <sup>6</sup>:

C12N 15/53, 9/04, C12P 7/02

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/47684

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 23. September 1999 (23.09.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/00848

(22) Internationales Anmeldedatum:

18. März 1999 (18.03.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 12 004.4

19. März 1998 (19.03.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HUMMEL, Werner [DE/DE]; Claudiusstrasse 11, D-52445 Titz (DE). RIEBEL, Bettina [DE/DE]; Waidmannstrasse 7-9, D-60596 Frankfurt am Main (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: . FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Personal und Recht Patente (PR-PT), D-52425 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. März 2000 (23.03.00)

(54) Title: DEHYDROGENASES WITH IMPROVED NAD-DEPENDENCE, THE PRODUCTION THEREOF, AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: DEHYDROGENASEN MIT VERBESSERTER NAD-ABHÄNGIGKEIT, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

#### (57) Abstract

The NADH specificity of preferred NADPH-dependent dehydrogenases can be improved by basicity reduction in the coenzyme docking area through corresponding genetically engineered modification of the relevant amino acid sequence. Dehydrogenases with NADH-dependence suitable for preparative purposes which correspond to a k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> value for NAD+≥20 can be microbially obtained. To this end, a microorganism is used which codes for the enzyme and which has a gene sequence in the genetic code. The gene sequence codes for the enzyme with an amino acid sequence whose basic amino acid(s) are at least partially replaced on the coenzyme binding site or sites by uncharged amino acids. Alternatively or additionally, basic or positively charged or uncharged amino acid(s) can be replaced by negatively charged amino acid(s). The inventive method is especially used for obtaining short-chain dehydrogenases with coenzyme binding sites on the N-terminus. According to the example, alcohol-dehydrogenases were obtained with the aid of E.coli HB101+ (pUBS 520) which contains the mutated gene in an overexpressed manner. Said gene codes for the dehydrogenase and is cloned in the expression plasmi pKK-117-3HB.

#### (57) Zusammenfassung

Die NADH-Spezifität von bevorzugt NADPH-abhängigen Dehydrogenasen kann durch Basizitätsminderung im Coenzym-Andockbereich durch entsprechende gentechnologische Abwandlung der relevanten Aminosäure-Sequenz verbessert werden. So können Dehydrogenasen mit für präparative Zwecke tauglicher NADH-Abhängigkeit entsprechend einem k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>- Wert für NAD+ ≥ 20 mikrobiell dadurch gewonnen werden, daß man einen für das Enzym kodierenden Mikroorganismus mit einer Gen-Sequenz im genetischen Kode verwendet, die für das Enzym mit einer Aminosäure-Sequenz kodiert, deren basische Aminosäure(n) an der Coenzym-Bindungsstelle bzw. den -stellen zumindest teilweise durch ungeladene Aminosäuren ersetzt ist bzw. sind. Alternativ oder zusätzlich können basische bzw. positiv geladene oder ungeladene Aminosäure(n) durch negativ geladene Aminosäure(n) ersetzt sein. Das Verfahren wird insbesondere für die Gewinnung von short-chain Dehydrogenasen mit Coenzym-Bindungsstellen am N-Terminus angewandt. Gemäß Beispiel wurde Alkohol-Dehydrogenase mit Hilfe von E.coli HB101+ (pUBS 520) gewonnen, der das für die Dehydrogenase kodierende mutierte Gen, kloniert im Expressionsplasmi pKK-117-3HB, überexprimiert enthält.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑÜ	Australien	GA	Gabun	LÝ	Lettland	SZ	Swasiland
AZ.	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF.	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	uz	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		2300040
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: Jonal Application No

		PCI/DI	E 99/00848
A. CLASSIF IPC 6	C12N15/53 C12N9/04 C12P7/02		
	International Patent Classification (IPC) or to both national classificat	ion and IPC	
B. FIELDS		<del></del>	
Minimum do	cumentation searched (classification system followed by classification C12N C12P	n symbols)	
	ion searched other than minimum documentation to the extent that su		
Electronic da	ala base consulted during the international search (name of data base	e and, where practical, search ten	ms used)
C. DOCUME	NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	Relevant to daim No.
X	NAKANISHI M ET AL: "Swith of coesspecificity of mouse lung carbony reductase by substitution of threwith aspartic acid" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 4, 1997, pages 2218 XP002127499 MD US	1 onine 38	1-5
Y	the whole document	/	6,9
X Furti	ner documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members a	are listed in annex.
"A" docume consid "E" earlier of filling d "L" docume which citation "O" docume other i "P" docume later tr	ent defining the general state of the art which is not lered to be of particular relevance socument but published on or after the international leads to the state of the stat	"Y" document of particular relevar cannot be considered to invo document is combined with o	nflict with the application but inple or theory underlying the siple or theory underlying the siple or theory underlying to cannot be considered to en the document is taken alone note; the claimed invention olve an inventive step when the one or more other such docuping obvious to a person skilled one patent family
1	8 January 2000	04/02/2000	
Name and r	mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL – 2280 HV Riswijk  Tel. (+31–70) 340–3016  Fax: (+31–70) 340–3016	Authorized officer  Espen, J	The second secon

2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

0

Int itional Application No PCT/DE 99/00848

		PCT/DE 99	0/00848
C.(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	<del></del>	<del></del>
Category '	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
x	NAKANISHI M ET AL: "Involvement of two basic residues (Lys-17 and Arg-39) of mouse lung carbonyl reductase in NADP(H)-binding and fatty acid activation: site-directed mutagenesis and kinetic analyses"  JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 120, 1996, pages 257-263, XP002127500 TOKYO JP		1-5
Y	the whole document		6,9
Y	HUMMEL W: "NEW ALCOHOL DEHYDROGENASES FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL COMPOUNDS" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, DE, SPRINGER, BERLIN, vol. 58, page 145-184 XP000677754 ISSN: 0724-6145 page 171		6,9
		•	
	·		
	·		
	·		

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen PCT/DE 99/00848

		1 , .	2 3 2 7 0 0 0 10
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12N15/53 C12N9/04 C12P7/02		
Nach der in	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	sifikation und der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchies IPK 6	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol C12N C12P	ie)	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	weit diese unter die recherchierten	Gebiete fallen
Während da	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verw	endete Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie®	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKANISHI M ET AL: "Swith of coe specificity of mouse lung carbony reductase by substitution of thre	1	1-5
	with aspartic acid" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 4, 1997, Seiten 2218 XP002127499 MD US	-2222,	
Υ	das ganze Dokument		6,9
		/	
	-	/	·
	lere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu lehmen	Siehe Anhang Patentfam	ilie
"A" Veröffe aber n "E" älteres	ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen	oder dem Prioritätsdatum vert Anmeldung nicht kollidiert, soi Erfindung zugrundeliegenden Theorie angegeben ist	nach dem internationalen Anmeldedatum öffentlicht worden ist und mit der ndem nur zum Verständnis des der Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
scheir ander	ntlichung, die geeignet ist, einen Priontätsanspruch zweitelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdaturm einer en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	kann allein aufgrund dieser Ve erfinderischer Tätigkeit beruh "Y" Veröffentlichung von besonder kann nicht als auf erfinderisch	rer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung er Tätigkeit beruhend betrachtet
"O" Veröffe eine B "P" Veröffe dem b	entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Intlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach Beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		_
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internation	nalen Recherchenberichts
<u> </u>	8. Januar 2000 Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	04/02/2000  Bevollmächtigter Bedienstete	•
Hallie u	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk	Describing the perior wells.	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Espen, J	

2

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int :ionales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00848

		DE 99/00848
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie'	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKANISHI M ET AL: "Involvement of two basic residues (Lys-17 and Arg-39) of mouse lung carbonyl reductase in NADP(H)-binding and fatty acid activation: site-directed mutagenesis and kinetic analyses"  JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 120, 1996, Seiten 257-263, XP002127500	1-5
Υ .	TOKYO JP das ganze Dokument	6,9
Y	HUMMEL W: "NEW ALCOHOL DEHYDROGENASES FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL COMPOUNDS" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, DE, SPRINGER, BERLIN, Bd. 58, Seite 145-184 XP000677754	6,9
	ISSN: 0724-6145 Seite 171	
	<del></del>	
,		
		·
İ		
	·	
		·

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)